Aus der Physiologisch-Chemischen Anstalt der Universität Basel

Zur Bestimmung der Harnkolloide

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Hermann Werder, med. pract.

aus St. Gallen

ZUG
Buchdruckerei J. Kündig
1927

Aus der Physiologisch-Chemischen Anstalt der Universität Basel

Zur Bestimmung der Harnkolloide

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Hermann Werder, med. pract.

aus St. Gallen

ZUG
Buchdruckerei J. Kündig
1927

Genehmigt von der medizinischen Fakultät
auf Antrag von Herrn Professor Spiro.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Zur Bestimmung der Harnkolloide.

Der Fortschritt in der Erkenntnis der experimentellen Naturwissenschaften ist sehr häufig an die Ausbildung und Vervollkommnung der Methodik geknüpft und die Klassiker der Physiologie zum Beispiel sind ja gerade jene Meister gewesen, welche wie H. Helmholtz und C. Ludwig jeweilen die sehr komplizierte Apparatur sich schafften, mit der sie im Stande waren, die sich aufdrängenden biologischen Fragen exakt zu lösen. Gelegentlich finden wir aber auch Forscher, die mit der Anwendung längst bekannter Methoden erhebliche oder sogar bahnbrechende Fortschritte erreichten. Hierfür das beste Beispiel ist wohl die Entdeckung der Kolloide durch Th. Graham[1]) mit Hilfe der Dialyse. Als zwei Welten der Materie bezeichnete er die beiden Zustände, die wir jetzt als molekular-dispers und kolloid-dispers zu trennen pflegen und legte damit den Grund zu einer Erkenntnis, die, man kann sagen, die gesamte Biologie umgestaltet hat und deren Bedeutung für Wissenschaft und Technik noch kaum zu übersehen ist.

Die einfache Methode der Dialyse, die es ermöglichte, molekular-disperse und kolloid-disperse Stoffe von einander zu trennen, muss daher überall dort von Bedeutung sein, wo eine Scheidung der genannten beiden Zustandsformen, die ja in jeder Zelle und in jeder biologischen Flüssigkeit vergesellschaftet vorkommen, erwünscht ist. In der Tat ist sie auch vielfach und längst von Physiologen in diesem Sinne angewandt worden, so von C. Ludwig[2]) in seinen grundlegenden Untersuchungen über die Frage der Resorption, von F. Hoppe-Seyler[3])[4]) für die Trennung der Albumine von den Globulinen und von Fr. Hofmeister[5]) für die Abscheidung der adialysablen Stoffe aus dem Harn. Zu den vom letztgenannten Forscher angeregten Fragen sollen die nachfolgenden Versuche einen bescheidenen Beitrag liefern.

Schon vor den Untersuchungen Hofmeisters und seiner Schüler war das Vorkommen von solchen Stoffen im Harn, die wir heute Kolloide nennen, bekannt. Es braucht ja nur an

das schon den alten Aerzten bekannte Phaenomen der Nubecula erinnert zu werden, jenes aus den Harnwegen stammende, von K. Mörner[6]) neuerdings studierte Mucoid, das sich beim Stehen des Harns langsam als Wölkchen abscheidet. Aber gegenüber den vielfachen, meist nur rein qualitativen Untersuchungen über Harnkolloide (Harnfermente, Mucin, Nucleoalbumin, Albumosen, Chondroitinschwefelsäure,[7]) Albumin[8]) bedeuten die Versuche der Hofmeister'schen Schüler insofern einen wesentlichen Fortschritt, als in ihnen eine bestimmte Klasse der Kolloide, nämlich die adialysablen Stoffe, zur quantitativen Bestimmung gelangten. Während Sasaki[8]) [9]) 0,28—0,68 g von ihnen pro Liter fand, ergaben sich Ebbecke[10]) in Versuchen bei Männern bis zu 1,32 g pro Liter. Ein besonderes Interesse verdienen die Abweichungen von der Norm, die Savarè[11]) und Ebbecke fanden, eine Steigerung in der Gravidität, beim Fieber, Pneumonie, Nephritis und besonders bei Eklampsie.

Leider sind aber die Versuche dieser Art technisch nicht so einfach, dass damit Reihenversuche z. B. in der Klinik gemacht werden können. Auch Hofmeister und seine Schüler haben mit einer relativ nur geringen Zahl von Harnen gearbeitet, ebenso jene Forscher, die die Bestimmung der Kolloide durch (alkohol-fällbaren) Stickstoff oder die Ultramikroskopie heranzogen. Und doch muss es hier erwünscht erscheinen, gerade wo es sich um eine Summe kaum oder gar nicht bekannter Stoffe handelt, zur Gewinnung eines Durchschnittes ein grosses Zahlenmaterial beizubringen. Es ergab sich daher die Frage, ob nicht die neueren Methoden der Kolloidforschung gegenüber jenen älteren Methoden es erlaubten, eine einfachere und womöglich quantitative Versuchsanordnung anzuwenden.

Von expeditiven Methoden scheinen mir im wesentlichen drei in Betracht zu kommen:

1. Adsorption;
2. Messung der Oberflächenspannung und Viscosität;
3. Ultrafiltration.

Von ihnen scheint mir die erste, die Adsorption, die einfachste zu sein. Beim Schütteln mit Tierkohle z. B. werden die Kolloide sehr schnell adsorbiert, das Gleichgewicht stellt sich

in wenigen Minuten ein und die Filtration geht rasch von statten. Leider aber ist die Adsorption ein sehr komplexer Vorgang. Es werden — ich gebe weiter unten dafür mit der von mir ausgearbeiteten Methode einen neuen Beweis — nicht nur die Kolloide, sondern noch viele andere Stoffe auch adsorbiert, das ganze kolloidale und ionale Milieu wird verändert. Adsorptionsversuche sind zur Klärung der statischen Verhältnisse bei physikalisch-chemischen Fragen ungeeignet. Das ergibt sich schon aus den Versuchen von Löffler und Spiro,[12]) aus der Theorie der Adsorption von L. Michaelis und P. Rona[13]) und das hat z. B. für die H-Ionenkonzentration des Harns Staehelin[14]) in unserm Institut experimentell gezeigt. Gerade aber die Konzentration der H-Ionen ist, wie neuerdings wieder gezeigt wurde (P. Rona und H. Petow),[15]) für die Beständigkeit von Komplexverbindungen von allerwesentlichster Bedeutung.

Die Stalagmometrie[16]) ist, seitdem sie von J. Traube und Ferd. Blumenthal in die Physiologie eingeführt wurde, vielfach, so besonders von Bechhold und seinen Schülern, Schemanski, Joël, Przibram, auch für die Untersuchung des Harns angewandt worden.

Die vorhandenen Zahlen sind nun an und für sich und namentlich im Interesse der Diagnostik sehr interessant, können jedoch meiner Ansicht nach nicht systematisch zu einer quantitativen Charakterisierung der Kolloide verwendet werden. Viskositätsbestimmungen sind für die Kennzeichnung der Kolloide ausserordentlich wichtig, weil wir damit Zustandsänderungen, Ioneneinflüsse u. s. w. auf Kolloide sehr gut feststellen können. Aber gerade weil die Kolloide von dem Milieu, in dem sie sich befinden, so stark abhängig sind, und weil ausserdem jene Stoffe, welche auf die Viscosität Einfluss haben, so sehr der Variabilität unterliegen, kann die Bestimmung der Oberflächenspannung nicht zur Kennzeichnung eines Gemenges dienen, wie es der Harn ist, in dem die beeinflussten Stoffe (Kolloide) sowohl wie auch die beeinflussenden starkem Wechsel unterworfen sind.

Es wird lohnend sein, wenn einmal eine quantitative Bestimmungsmethode der Harnkolloide ausgearbeitet ist, fest-

zustellen, inwieweit die stalagmometrischen Werte durch Kolloide, inwieweit sie durch Kristalloide bedingt sind.

Am meisten Aussicht, die Harnkolloide quantitativ fassen zu können, scheint einstweilen die Ultrafiltration zu bieten, die ja schon sehr wesentliche Dienste zur Kenntnis des Kolloidgefüges des Serums geleistet hat. Man muss sich freilich darüber klar sein, dass dabei das Eigenvolum der Kolloide, ihre Adsorptionswirkungen und vor allem das Donnan-Gleichgewicht eine sehr erhebliche Rolle spielen. Das hat auf Grund physikalischer Untersuchungen, Ueberlegungen und zahlreicher in der Literatur vorhandener Zahlen A. Augsberger[17]) in seiner Arbeit aus unserer Anstalt ausführlich dargelegt.

Es ist also schwer, ja sogar gegenwärtig noch unmöglich, in Blut oder Harn über den Zustand der einzelnen Stoffe — ional oder komplex gebunden — genauere Angaben zu machen. Wohl aber kann man die Summe der durch Ultrafiltration zurückgehaltenen Stoffe in einer ihrer wichtigsten Eigenschaften, annäherungsweise bestimmen, in jener nämlich, die allen hydrophilen Kolloiden zukommt, als Schutzkolloid bei der Fällung von Suspensionskolloiden zu dienen. Natürlich kommen wir aber hierbei — das geht aus der Arbeit von Augsberger deutlich hervor, — nicht zu absoluten Werten, sondern nur zu solchen die unter einander verglichen werden können. Die folgenden Versuche sind daher auch nur als orientierende anzusehen, ob eine eingehendere Bearbeitung für die Harnsemiotik wertvolle Resultate verspricht.

Bekanntlich ist die Schutzwirkung der Kolloide quantitativ gemessen zuerst studiert worden von R. Zsigmondy und F. N. Schulz[18]) mit dem vom erstern leicht zugänglich gemachten ‚kolloidalen Gold'. Die Goldzahl spielt seither in der klinischen Diagnostik speziell bei Veränderungen des Liquor eine bedeutende Rolle, worüber uns die jüngst erschienene Monographie von E. Joël[21]) in vortrefflicher Weise unterrichtet. Auch auf den Harn ist diese Methode schon angewandt worden. Als normale Goldzahlwerte gelten solche zwischen 3,5 und 7,0 mg unabhängig von Konzentration und Reaktion des Harns, auch die Sedimentbildung scheint keinen Einfluss zu haben, indem in stark sedimentierenden Harnen zum Teil

viel, zum Teil gar kein Schutzkolloid gefunden wurde. Das Alter der Spender scheint keinen Einfluss zu haben, wohl aber die Nahrung, indem z. B. nach Fleischtagen eine geringe Erhöhung der Kolloidausscheidung gefunden wurde. Wenig Kolloide, Goldzahl meist höher als 15,0, fand sich bei Psychopathen.

Was endlich die Art der Harnkolloide anlangt, so ist man hierfür über die Befunde der Hofmeister'schen Schule seither nicht viel hinausgekommen. Ich bin bei den nun folgenden Untersuchungen davon ausgegangen, zunächst möglichst einfache Methoden zu verwenden. Als solche kamen die Giemsa- bezw. die Bechhold'sche Ultrafiltration in Anwendung. Als Schutzkolloid habe ich Kongorubinlösung verwandt, die ja jedenfalls den klinischen Laboratorien leichter zugänglich ist als das Zsigmondy'sche kolloidale Gold.

Qualitativer Teil.

In den folgenden Ausführungen sollen Untersuchungen über Harnkolloide besprochen werden, die sich sämtlich auf die Trennung der Kolloide vom Lösungsmittel und den Kristalloiden mit Hilfe der Ultrafiltration stützen. Ausgangsmaterial waren in den meisten Fällen Harne klinisch Gesunder und zwar meist Harngemische mehrerer Miktionen, seltener Einzelportionen. Wo es sich um Sammelmengen von 24stündigem Harn handelt, ebenso wenn Harn von Kranken zur Verwendung kam, sind die betreffenden Angaben vermerkt.

Ultrafiltration.

Zur Ultrafiltration wurde zum Teil die Apparatur nach Giemsa,[19]) zum Teil die von Bechhold[20]) angegebene in Anwendung gebracht, die beide im Wesentlichen dieselben Erfolge gaben. Die Ultrafiltermembran bestand aus gelatinisiertem Eisessigkollodium von acht Prozent Gehalt an nitrierter Baumwolle. Das Kollodium wurde in unserm Institut selbst hergestellt. Die Eichung der Porenweite der Filtermembran erfolgte durch Beschickung mit einer verdünnten Lösung von Nachtblau, das die Membran eben nicht mehr passieren sollte. Zur Erreichung einer annähernd neutralen Reaktion des Filters wurden die Filter stets längere Zeit (mindestens 36 Stunden) in mehrmals gewechseltem destilliertem Wasser aufbewahrt, sodann mit verdünnter Ammoniaklösung und hierauf mehrmals mit destilliertem Wasser durchgespült. Stichproben mit Lakmustinktur oder Bromthymolblau ergaben die Gewissheit, dass unter solchen Kautelen die Membran das Filtrans in seiner chemischen Reaktion nicht verändert. Die ersten 5 oder mehr Kubikzentimeter des Filtrats wurden jeweils verworfen, sodass eine möglichst einwandfreie Beschaffenheit des Filtrates gewährleistet war. Die Vorlage stand in einem mit Wasser am Boden gefüllten Saugkolben, um durch die damit erzielte Wasserdampf-gesättigte Atmosphäre ein Verdunsten des Ultrafiltrats unter dem Vacuum auf ein Minimum zu reduzieren.

Ultrafiltration und Wasserstoffionenkonzentration.

Wie oben erwähnt soll von einem lege artis bereiteten Ultrafilter verlangt werden, dass seine Membran die chemische Reaktion der das Filter passierenden Substanz nicht verändert, die Wasserstoffionenkonzentration des Ausgangsmaterials und die des Ultrafiltrats also die gleiche ist. Das gilt in dieser absoluten Weise jedoch nur für CO_2-freies destilliertes Wasser. Weniger einfache Substanzen, Salzlösungen und vor allem und in besonderem Masse so komplizierte mehrphasige Systeme, mit denen wir es bei der Untersuchung von Harn zu tun haben, können bei dieser wenn auch einfachen physikalischen Behandlung von der genannten Forderung abweichen.

In der Tat liessen vergleichende kolorimetrische Untersuchungen der Wasserstoffionenkonzentration nativen Harnes mit der des Ultrafiltrats in mehreren Fällen deutliche Differenzen der pH erkennen. Die pH-Messung erfolgte durch Vergleich mit den Standard-Röhrchen nach Walpole mit Hilfe der dabei gebräuchlichen Indikatoren.

Es fiel auf, dass besonders stark saure Harne — oder künstlich angesäuerte — den grössten Unterschied in der pH des Harnes und der des Ultrafiltrates ergaben. Die nächstliegende und wohl auch plausible Erklärung dieser Beobachtung dürfte die sein, dass unter dem zur Ultrafiltration nötigen Vacuum die gelöste Kohlensäure entweicht und daher das Filtrat eine weniger saure Reaktion zeigte. Zu dieser Erklärung passt auch die Beobachtungstatsache, dass nie ein umgekehrtes Ergebnis sich einstellte, also nie das Filtrat saurer als das Ausgangsmaterial war.

Ultrafiltration und Harnfermente.

Das Vorkommen der verschiedenen Fermente im Harn ist den Physiologen und physiologischen Chemikern schon lange bekannt. Ihre Deutung, ob sie als ‚Fermentschlacken' des Organismus oder als Arbeitsprodukt der Zellen des Harnsystems aufzufassen sind, ist bis heute noch nicht eindeutig gegeben, doch dürfte die erstgenannte Erklärung bei der untergeordneten Bedeutung, die dem Auftreten von Fermenten im Harn zugemessen wird, mehr Anhänger haben. Für uns kann hier die

Frage nach Sinn, Zweck und Herkunft der Harnfermente ausscheiden, sie haben aber vielleicht Bedeutung bei einer physikalisch-chemischen Beleuchtung der Probleme, die sich an die Untersuchungen über die Zusammensetzung des Harns knüpfen. Es ist bei der heute noch im Dunkeln liegenden Kenntnis der chemischen Identität und Konstitution der meisten Fermente wohl angängig, sie — ohne damit etwas über ihren Bau aussagen zu wollen — als Körper anzusehen, die sich nicht in molekular-dispersem, sondern in kolloid-dispersem Zustand befinden. Die Trennung der genannten beiden Phasen wird uns, unter der Voraussetzung, dass die zur Trennung angewandte Methode auch wirklich ihren Anforderungen genügt, über die Frage des Lösungszustands der Fermente Klarheit verschaffen. Bei den Fermenten, deren Vorhandensein im Harn unbestritten bekannt und auch von Neuem hier in den besprochenen Untersuchungen festgestellt worden ist, Lab, Pepsin und Diastase kam der kolloide Charakter derselben denn auch klar zum Ausdruck, indem keines der genannten Fermente das Ultrafilter passierte. Das Vorhandensein der genannten Fermente im Nativ-Harn war durch ihre spezifischen Funktionen klar erwiesen. So muss denn den Fermenten in der Reihe der den Kolloidgehalt eines Harnes bedingenden Stoffe ein, wenn auch quantitativ kleiner Platz eingeräumt werden.

Ultrafiltration und Harnsäuregehalt.

Die Frage nach der Löslichkeit der Harnsäure, der Abhängigkeit der Löslichkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, vom Lösungsmittel, von mitgelösten Stoffen und von Schutzkolloiden ist in neuerer Zeit durch die Arbeiten von Jung[22]) und Anderen ein gutes Stück des Weges zu ihrer Lösung weiter gekommen. Ob es sich dabei aber stets um eine echte Lösung handelt oder ob nicht ein Teil der im Lösungsmittel sich befindenden Harnsäure kolloiddispers darin enthalten ist, wurde bis heute meines Wissens nicht untersucht. Es liegt nahe, zur Lösung dieser Frage die Methode der Ultrafiltration herbeizuziehen. Von den beiden Harnen, die untersucht wurden, liess der eine deutlich weniger Harnsäure in seinem Ultrafiltrat nachweisen als im Ausgangsmaterial, während beim andern

der Unterschied im Harnsäuregehalt von Nativ-Harn und Ultrafiltrat innerhalb der Fehlergrenze der Methode lag. Wenn diesen wenigen Proben eine Folgerung entnommen werden darf, so lässt sich sagen, dass ein Vorkommen kolloidalgelöster Harnsäure im Harn möglich, jedoch nicht in allen Fällen anzunehmen ist, für den allgemein gefassten Begriff der Harnkolloide als Summe aller im Harn angenommener Kolloide ist kolloidale Harnsäure jedenfalls ohne grosse Bedeutung.

Ultrafiltration und Zuckergehalt.

Der Chemismus des Diabetikerharns ist so gründlich studiert und so wohl bekannt, dass eine Untersuchung des Ultrafiltrats von Zuckerharn keine überraschenden Ergebnisse zu zeitigen verspricht. Es ist anzunehmen, dass der Zucker, welcher bei den feinern quantitativen Zuckeranalysen sich an der Reaktion beteiligt, zu den molekular- dispersen Körpern gehört und demgemäss quantitativ im Ultrafiltrat zu erscheinen hat. Diesen Erwartungen entsprachen denn auch die Untersuchungsergebnisse durchaus: Der Zuckergehalt des Ultrafiltrates eines Diabetikerharnes entsprach genau dem des Ausgangsmaterials. Das Ergebnis mag gleichzeitig eine Kontrolle der Ultrafiltrationsmethode bedeuten, indem, wie gefordert werden muss, eine Adsorption der Kristalloide durch die Filtermembran nur in allergeringstem Masse die physikalisch-chemischen Vorgänge bei der Ultrafiltration beeinträchtigen darf.

Ultrafiltration und Eiweissgehalt.

Das Eiweiss oder besser die Eiweisskörper gelten beinahe als Prototyp kolloidaler Körper. Wie zu erwarten, ergab die Ultrafiltration wenig und stark eiweisshaltiger Harne das völlige Fehlen des Eiweiss im Ultrafiltrat. Als Eiweissreaktion wurde die sehr feine Werte anzeigende qualitative Kochprobe angewandt, wie sie überall in den klinischen Laboratorien üblich ist. Im Zusammenhang mit den Proben auf Passieren des Zuckers sei gleich erwähnt, dass bei vorhandener Apparatur die Ultrafiltration eine saubere und einfache Methode ist, eiweisshaltigen Zuckerharn zu ‚enteiweissen' und auch wegen der Klarheit und Farbstoffarmut des Ultrafiltrats die quantitative Zuckerbestimmung durch das Polarimeter zu erleichtern.

Versuche mit Kongorubin.

Zur Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Bemessung der Schutzkolloide diente folgende von Zsigmondy stammende Ueberlegung als Grundlage: Salze zu einer Lösung von rotem Kongorubin gebracht lassen die Farbe der Lösung von rubinrot über violett nach rein blau umschlagen. Diese Farbänderung beruht nach Wo. Ostwald[23]) auf einer Dispersitätsvergröberung des kolloid-dispersen Farbstoffs. Sind aber in derselben Lösung gleichzeitig Kolloide vorhanden, die kraft ihrer entsprechenden elektrischen Ladung eine Schutzwirkung auf die Suspension der Kongorubinteilchen auszuüben im Stande sind, so tritt der genannte Umschlag von rubinrot nach blau erst bei einer viel stärkern Konzentration des Salzes auf, das heisst: die Dispersitätsvergröberung wird durch die Anwesenheit von Schutzkolloiden gänzlich oder teilweise verhindert.

Geben wir in ein Versuchsröhrchen mit Kongorubinlösung eine kleine Menge Harn, in ein zweites gleiches Röhrchen eine ebensolche Menge Ultrafiltrat dieses Harns, sodann in beide Röhrchen eine gleiche Menge verdünnter Salzlösung, so kann im ersten Röhrchen die Farbe des Kongorubins gleich bleiben, während im zweiten sich ein Umschlag in violett zeigt.

Das Eintreten dieser Reaktion, beziehungsweise ihre quantitative Auswertung ist aber an einige Voraussetzungen gebunden: Dosierung, Konzentration, Dauer der Einwirkung u. v. A. können die Ablesung der Reaktion beeinträchtigen. An Hand von Vorversuchen stellte es sich als optimal heraus, folgende Punkte einzuhalten:

1. Konzentration der Kongorubinlösung: Verdünnte Lösungen geben den Farbumschlag graduell und zeitlich später an als konzentriertere, die jedoch ihrerseits wegen ihrer Dunkelheit in der Durchsicht durch das Röhrchen die Farbänderung nur schwer erkennen lassen. Am vorteilhaftesten erwies sich eine Lösung von 3 Teilen Kongorubin auf 10,000 Teile Wasser. Als Stammlösung diente eine Lösung von pulverisiertem reinem Farbstoff in Wasser von der Konzentration 1 : 1000, die dann zur Vertreibung der Kohlensäure im Wasserbad vor-

sichtig bis gegen Siedetemperatur erwärmt und unter Kohlensäureabschluss aufbewahrt wurde. Eine derartige Lösung ist, wie schon Wo. Ostwald berichtet, monatelang haltbar. Drei Teile dieser Stammlösung auf zehn Teile Wasser geben dann die erwünschte optimale Versuchslösung.

2. Temperatur. Eine nach violett oder blau umgeschlagene Lösung von Kongorubin wird durch Erwärmen wieder rubinrot. Die Schwankungen, die der Begriff der Zimmertemperatur in sich schliesst, sind aber für diese Beobachtung ohne Bedeutung, sodass Versuche, die im Laboratorium angestellt werden, in dieser Hinsicht kaum beeinträchtigt werden und sehr wohl vergleichbare Werte ergeben.

3. Wasserstoffionenkonzentration. Kongorubin ist wie das ihm nahe verwandte Kongorot ein feiner Säureindikator. Es ist deshalb wichtig, dass bei Untersuchungen auf die Ostwald'sche Rubinzahl nicht die Acidität der Versuchsflüssigkeiten den Farbumschlag bewirkt. Die Untersuchungen über diese Frage ergaben, dass im pH-Bereich menschlicher Harne der Farbumschlag nicht durch die Acidität bedingt ist. Vorsichtshalber können die Kongorubinlösungen statt mit Wasser mit dem $mol/_{15}$ Soerensen'schen [24]) Phosphatpuffergemisch von der pH 7,0 auf die gewünschte Verdünnungsquote gebracht werden, ohne dass dabei die Versuchsanordnung geändert zu werden braucht. Um vergleichbare Werte zu erhalten, muss dann natürlich stets mit denselben Lösungen gearbeitet werden.

4. Art der Ablesung und Limes. Es braucht kaum hervorgehoben zu werden, dass bei Reihenversuchen eine Auswahl der Versuchsröhrchen nach demselben Kaliber nötig ist. Wir verwendeten für unsere Versuche kleine Röhrchen von etwa acht Millimeter Durchmesser. Die Ablesung erfolgt am besten bei auffallendem Tages- oder blaugefiltertem künstlichen Licht. Als Limes bei der Ablesung wurde dasjenige Röhrchen angenommen — in Anlehnung an die Ostwald'sche Rubinzahl — das eben noch keine Veränderung der rubinroten Farbe zeigte. Da die Farbreaktion auch eine Funktion der Zeit ist, sollte die Ablesung nach einer bestimmten willkürlich angenommenen Zeit erfolgen. Bei der hier angegebenen Versuchsanordnung zeigte es sich, dass nach Ablauf einer halben Stunde

keine wesentliche Farbänderung mehr auftritt, dass also die Ablesung nach einer halben Stunde oder später erfolgen kann, jedenfalls aber nicht zu früh.

Die Anordnung und die Resultate der einzelnen Versuchsreihen sind im quantitativen Teil angegeben, hier soll nur über die Versuchsergebnisse im Allgemeinen berichtet werden. Fallende Mengen Harn und parallel dazu ebensolche Mengen Ultrafiltrat lassen in den meisten Fällen einen Unterschied in der Wirkung auf Kongorubin erkennen und zwar in dem Sinne, dass häufig der Farbumschlag bei der Ultrafiltratreihe zeitlich und graduell früher eintritt als in der Harnreihe. Der Unterschied in den beiden Reihen lässt bei dem jeweils gegebenen Salzgehalt des Harns einen quantitativen Schluss auf die Menge der im Harn enthaltenen Kolloide zu. Die Rubinzahl des Ultrafiltrats ist meist grösser als die des Harns. Unter Rubinzahl verstehen wir in diesem Zusammenhang mit Wo. Ostwald den Verdünnungsfaktor der Probe, die eben noch keinen Einfluss auf die Farbe des Kongorubins ausübt. Zusammenfassend über viele Parallelversuche mit Harn und Ultrafiltrat lassen sich die untersuchten Harne in drei Gruppen einteilen, die sich durch ihre Beziehung der Rubinzahl des Harns zu der des Ultrafiltrats unterscheiden:

1. Harne mit positivem Ausfall beim Vergleich der Kongorubinreaktionen.

a. Direkt: Der Farbumschlag des Kongorubin tritt bei der Ultrafiltratreihe spontan oder mehrere Röhrchen früher ein als bei der Nativ-Harnreihe. Das sind die Harne mit verhältnismässig hohem Salz- und hohem Kolloidgehalt.

b. Indirekt: Der Farbumschlag erfolgt nicht spontan. Zugabe von 10 % Kochsalzlösung löst den Umschlag aus, der bei der Harnreihe mit steigender Menge des Harns geringer wird. Das sind die Harne mit hohem Kolloid- aber geringem Salzgehalt.

2. Harne mit mangelndem Unterschied bei Vergleich der Kongorubinreaktionen.

a. Direkt: Salzreiche kolloidarme Harne. Hier tritt bei bei-

den Reihen ein Farbumschlag ein, der aber in beiden Reihen denselben Limes zeigt.

b. Indirekt: Salzarme kolloidarme Harne. Hier tritt weder spontan ein Unterschied der beiden Reihen ein noch lässt sich durch Salzzugabe ein solcher sekundär nachweisen.

3. Harne mit „verkehrtem" Ausfall der verglichenen Kongorubinreaktionen.

Der Farbumschlag erfolgt in diesen Fällen in der Harnreihe früher als in der Ultrafiltratreihe. Die zuerst beobachteten Reihen dieser Art schienen ganz aus der Reihe zu fallen. Die Beobachtungen bestätigten sich aber in mehreren Kontrollen und eine Serie von Untersuchungen an Harnen chirurgischer Patienten, die wahllos dem klinischen Material entnommen wurden — es sind darunter auch einige durch Ureterkatherismus gewonnene, zum Vergleich der beiden Nieren — zeigte, dass dieser „verkehrte" Ausfall der Reaktion doch nicht so selten ist und dass ihm aber so wenig wie den andern Gruppen bisher klinisch-diagnostische Bedeutung zugemessen werden kann.

Die hier beschriebene Methodik zur Bestimmung der Harnkolloide unterscheidet sich von den bisher gebräuchlichen dadurch, dass an Stelle der quantitativ nur sehr schwer durchführbaren Dialyse die recht einfache Ultrafiltration angewandt wurde. Sie baut sich auf einen Vergleich der Schutzwirkung des nativen Harns und dessen Ultrafiltrat auf und lässt die kolloidreichen von den kolloidarmen Harnen trennen. Voraussetzung ist dabei, erstens, dass der Harn einen genügenden Salzgehalt hat, damit das Ultrafiltrat überhaupt fällend wirkt, zweitens aber, dass bei genügendem Salzgehalt auch hinreichend Kolloid vorhanden ist, um einen Unterschied zwischen Filtrans und Filtrat erkennen zu lassen.

Diese Methodik ist allein für sich, wie meine Versuche bei den verschiedenen Krankheitsformen ergeben haben, nicht geeignet zu einer speziellen Diagnose zu führen; immerhin

aber verdient sie, da zwischen den einzelnen Harnen sehr gut charakterisierbare, bisher nicht erkannte Differenzen bestehen, neben den bisher üblichen Methoden namentlich dort Anwendung, wo wie z. B. bei Nierenkrankheiten, gerade die eingehendere morphologische Charakterisierung des Harns auch von praktischer Bedeutung werden kann.

Quantitativer Teil und Protokolle.

1. Ultrafiltration und Wasserstoffionenkonzentration.

Harn eines klinisch Gesunden (pH 6,0)		Harn	Ultrafiltrat
49 ccm Harn + 1 ccm n HCl	pH	4,6	6,0
49 ccm Harn + 1 ccm $n/_2$ HCl	pH	5,4	5,5
49 ccm Harn + 1 ccm H_2O	pH	6,0	6,2
49 ccm Harn + 1 ccm $n/_2$ NaOH	pH	6,8	6,8
49 ccm Harn + 1 ccm n NaOH	pH	7,3	7,5

2. Ultrafiltration und Harnfermente.

a) Lab. Methodik bei Fuld u. Blum[25])

Nicht aktivierter Harn						Aktivierter Harn					
Nativ:											
2,0	1,0	0,6	0,4	0,2	ccm Harn	2,0	1,0	0,6	0,4	0,2	ccm Harn
—	—	—	—	—		+++	++	+	—	—	
Ultrafiltrat:											
2,0	1,0	0,6	0,4	0,2	ccm U'filt.	2,0	1,0	0,6	0,4	0,2	ccm U'f.

+ = Gerinnung. — = keine Gerinnung. Kontrollen alle —.

b) Pepsin. Versuchsanordnung nach Ellinger u. Scholz.[26])

Harn- resp. Ultrafiltratmenge ccm	2,0	1,5	1,0	0,5	0,1	0
Nativ-Harnreihe	+	++	+++	+++	+++	+++
				+	++	+++
Ultrafiltratreihe	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	++	++

+ = Niederschlag = unverdautes Kasein.

c) Diastase. Versuchsanordnung etwas modifiziert nach Wohlgemuth.[27])

(Harn, pH 5,4 Vormittagsmiktion.)

$1/_2$ % Stärkelösung ccm	10	10	10	10	10	10	
Harn- resp. Ultrafiltrat ccm	5	3	2	1	0,5	0,1	

Alle Röhrchen auf 15 ccm aufgefüllt.

Erfolg bei Prüfung mit Jodjodkali:

Harnreihe	+	+	+	+	±	−
Ultrafiltratreihe	−	−	−	−	−	−

+ = keine Blaufärbung = Verdauung.

3. Ultrafiltration und Harnsäuregehalt.

Harnsäurebestimmung nach Folin[28]), Kolorimeter nach Dubosq.

Harnsäuregehalt berechnet auf 100 ccm Harn

Zwei Harne klinisch Gesunder

1. Nativ-Harn	155,8 mg	Harnsäure
Ultrafiltrat	140,6 mg	Harnsäure
2. Nativ-Harn	125,1 mg	Harnsäure
Ultrafiltrat	125,0 mg	Harnsäure

4. Ultrafiltration und Zuckergehalt.

Quantitative Zuckerbestimmung nach Maquenne.[29]) Auf Grund des Tagestiters n/10 $Na_2S_2O_3$ = 0,862 korrigierte Werte.

1. Vor der Ultrafiltration mit Pb $(CH_3\ COO)_2$ ausgefällt:
   Im Nativ-Harn 20,34 im Ultrafiltrat 20,23*)
2. Nicht vorbehandelt:
   Im Nativ-Harn 20,27 im Ultrafiltrat 20,24*)

*) mg Glukose in 1 ccm.

5. Ultrafiltration und Eiweissgehalt.

Eiweissgehalt qualitativ durch die Kochprobe festgestellt.

Nephritis- und Schrumpfnieren-Harne. Zum Teil stark, z. T. schwach eiweisshaltig.

Die Ultrafiltrate zeigten bei der Kochprobe nicht mehr die geringste Trübung.

6. Messung der Harnkolloide am Kongorubin.

Vorversuche mit Harnen klinisch Gesunder. Einzelportionen.

Vorversuche 1.

Anordnung:

1. 0,5 ccm Nativ-Harn + 0,5 ccm H_2O + 5 ccm Kongorubin 2/10000.
2. 0,5 ccm Ultrafiltrat + 0,5 ccm H_2O + 5 ccm Kongorubin 2/10000.
3. 0,5 ccm H_2O + 0,5 ccm H_2O + 5 ccm Kongorubin 2/10000.

Dazu tropfenweise gesättigte NaCl-Lösung.

Farbumschlag des Kongorubins:

1. Bei 18 Tropfen
2. Bei 12 Tropfen } der NaCl Lösung.
3. Bei 13 Tropfen

Kontrollen mit Zutropfen von H_2O bleiben rubinrot.

Vorversuche 2.

Anordnung:

7 Reagenzgläser	1	2	3	4	5	6	7	
Harn	0	0	0,1	0,2	0,4	0,6	1,0	ccm
H_2O	1,0	1,0	0,9	0,8	0,6	0,4	0	ccm
Kongorubin 2/10000.	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	ccm
Farbumschlag	—	—	—	—	+	+	++	

Dieselben Reihen mit Ultrafiltrat an Stelle des Harns:

Farbumschlag	—	—	+	+	++	++	+++

(Ablesung nach 30') Dann in jedes Röhrchen (mit Ausnahme von Röhrchen No. 1) 0,5 ccm gesättigter NaCl-Lösung. 2. Ablesung nach weiteren 30'.

Farbumschlag der	1	2	3	4	5	6	7
Harnreihe	±	+++	++	++	+++	+++	+++
Ultrafiltratreihe	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++

7. Einfluss der H-Ionenkonzentration auf die Kongorubinreaktion.

Versuche mit Phosphatpuffergemisch nach Soerensen.

pH	5,4	5,8	6,2	6,6	7,0	7,4	7,8
Farbumschlag	—	—	—	—	—	—	—

Versuche mit Harn
Durch Zugabe von n-HCl angesäuert.

Anordnung der Röhrchen wie in Vorversuch 2. (pag. 18)

Nativ-Harn (pH 4,1)	− − − + + + + + + + + +	Harn No. 1
Ultrafiltrat (pH 4,8)	− − − + + + + + + + + +	
Nativ-Harn (pH 5,6)	− − − − − − −	Harn No. 2
Ultrafiltrat (pH 5,8)	− − − − − − −	

Harn No. 1 = 49,0 ccm Harn + 1,0 ccm 2n HCl

Harn No. 2 = 49,0 ccm Harn + 1,0 ccm n HCl.

8. Vergleich der Ultrafiltration mit Adsorption an Tierkohle.

Anordnung der Röhrchen:	1	2	3	4	5	6	
Zu untersuchende Flüssigkeit *)	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1	ccm
H_2O	31/32	15/16	7/8	3/4	1/2	1	ccm
Kongorubin 3/10000	4	4	4	4	4	4	ccm
Farbumschlag:	1	2	3	4	5	6	
*) 1. Harn	−	−	−	−	+	++	
2. Ultrafiltrat	−	−	−	+	++	++	
3. Filtrat des mit Tierkohle ausgeschüttelten Harns	−	−	−	−	−	−	
4. 10 % NaCl-Lösung	−	−	−	−	+	++	
5. Wasser (Kontrolle)	−	−	−	−	−	−	

Kontrollen an Tagesharngemischen. Pathologisches Material.

Anordnung der Röhrchen wie bei den Tierkohle-Versuchen (pag. 19.)

I. Harne mit positivem Ausfall der verglichenen Kongorubinreaktionen.

a) Direkt:	Röhrchen 1	2	3	4	5	6
1. Subchronische Glomerulonephritis:						
Harn-Reihe	—	—	—	—	—	—
Ultrafiltrat-Reihe	—	—	—	—	—	+
Kochsalz-Reihe	—	—	—	—	+	+
2. Perikarditis, Anaemie:						
Harn-Reihe	—	—	—	—	—	+
Ultrafiltrat-Reihe	—	—	—	—	+	+
Kochsalz-Reihe	—	—	—	—	+	+
3. Modellversuch mit Mastix-Sol und ein- und zweiwertigen Kationen:						
Nativ-Reihe	—	—	—	+	+	+
Ultrafiltrat-Reihe	—	—	+	+	+	+
Kochsalz-Reihe	—	—	—	—	+	+

In dieselbe Gruppe fielen bei späterer Untersuchung bei wahlloser Entnahme von Harnen chirurgischer Patienten: Fälle von: 1. Angioma frontis; 2. Tbc. genus.; 3. Schädelfraktur; 4. Multiple Frakturen.

b) Indirekt:						
1. Masern mit Bronchitis:						
Harn-Reihe	+	+	+	+	+	—
Ultrafiltrat-Reihe	+	+	+	+	+	++

Die Ablesung erfolgte nach Zugabe von je 0,5 ccm 10 % NaCl in jedes Röhrchen.

In dieselbe Gruppe fielen ferner Harne von Patienten mit: 1. Ischias (Gleichlautendes Ergebnis bei Vergleich der durch Ureterenkatheterismus gewonnenen getrennten Harne von rechts und links.) 2. Normaler Harn eines Gesunden (Ureterkatheterismus).

II. Harne mit mangelndem Unterschied bei Vergleich der Kongorubinreaktionen.

a) Salzreiche, kolloidarme Harne:

1. Diabetes mellitus
2. Masern

In dieselbe Gruppe fielen ferner Harne von Patienten mit: 1. Perinephritischem Abscess; 2. Zwei Fälle von Appendicitis acuta; 3. Ulcus ventriculi; 4. Malleolusfraktur; 5. Empyema pleurae.

b) Salzarme, kolloidarme Harne:

1. Nephritis interstitialis
2. Schrumpfniere, genuine
3. Schrumpfniere, genuine.

In diese Gruppe fielen auch die beiden Harne eines Ureterenkatheterisierten Gesunden.

III. Harne mit „verkehrtem" Ausfall der verglichenen Kongorubinreaktionen.

1. Scharlach
   ♂ 4 Jahre, 700 g Tagesmenge, 4. Krankheitswoche.

Harn-Reihe	—	—	—	+	+	+
Ultrafiltrat-Reihe	—	—	—	—	+	+
Kochsalz-Reihe	—	—	—	—	+	+

2. Scharlach
   ♀ 7½ Jahre, 900 g Tagesmenge, 4. Krankheitswoche.

Harn-Reihe	—	—	+	+	+	+
Ultrafiltrat-Reihe	—	—	+	+	+	+
Kochsalz-Reihe	—	—	—	—	+	+

In dieselbe Gruppe fielen ferner Harne von Patienten mit: 1. Rektumkarzinom; 2. Kniekontusion; 3. Handverletzung; 4. Zwei Fälle von Pyelitis. (Hierbei gleiche Ergebnisse beider Harne rechts und links.)

Alle Kontrollreihen mit Wasser blieben rubinrot.

Literatur.

1. Graham, Liebigs Ann. 121, p. 1—77, 1861.
2. Ludwig, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1880, Suppl. Bd.
3. Hoppe-Seyler, Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. I.
4. Hoppe-Seyler, Handbuch der physiol. Chemie. 3. Aufl. p. 196.
5. Hofmeister, Ergebn. d. Physiol. 1902, I. p. 759.
6. Moerner, Scand. Arch. f. Physiol. 6.
7. Pons, Hofmeisters Beiträge 9, 393, 1907.
8. Porges, Hofmeisters Beitr. 3, 277, 1903.
9. Sasaki, Hofmeisters Beitr. 9, 386, 1907.
10. Ebbecke, Biochem. Ztschr. 12, p. 485, 1908.
11. Savarè, Hofmeisters Beitr. 9, 141, 1907.
12. Löffler & Spiro, Helv. chim. acta II, p. 417 und p. 533.
13. Michaelis & Rona, Bioch. Z. 97, p. 57 und p. 85, 1919.
14. Staehelin, Schweiz. Med. W. 1922, Heft 51.
15. Rona & Petow, Bioch. Z. 137, p. 356, 149, p. 393, 150, 468.
16. Literatur über die Stalagmometrie bei Zsigmondy u. A.
17. Augsberger, Erg. d. Physiol. 24, 618.
18. F. N. Schulz & Zsigmondy, Hofmeisters Beitr. 3, 137, 1902.
19. Giemsa, Bioch. Z. 132 p. 488.
20. Bechhold, Abderhaldens Handb. Untrs. Meth. Abt. III, Teil B, Heft 2 p. 333.
21. E. Joël, Die Kolloide in Biologie und Medizin, Dresden u. Leipzig 1920.
22. Jung, Helv. Chim. Acta. V, 688 u. VI, 562. 1922 u. 1923. Daselbst Literatur.
23. Wo. Ostwald, Kolloidchem. Beih., X, 179.
24. Soerensen, Bioch. Z. 21, 131.
25. Fuld & Blum, D. M. W. 1910, p. 1063.
26. Ellinger & Scholz, D. Arch. f. klin. Med. 99, p. 221.
27. Wohlgemuth, Bioch. Z. 21, p. 432, 1909.
28. Folin, Journ. of Biol. Chemistr. 54, p. 153, 1922.
29. Maquenne, referiert in der Ztschr. f. analyt. Chemie. Bd. 38, p. 778.

Weitere Literatur in einschlägigen Lehrbüchern bes. Zsigmondy, Kolloidchemie, Leipzig 1925 u. A.